

実験的ラットグリオーマにおける 抗癌剤の膜透過性に関する研究

金沢大学医学部脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

中 島 良 夫

悪性脳腫瘍への抗癌剤の到達性には血液脳関門が大きく関与している。抗癌剤を脳腫瘍に選択的に送達させるためには、抗癌剤の脳腫瘍および脳組織への移行性を明らかにする必要がある。本研究ではラット脳内に 9L グリオーマを移植し、脳腫瘍における毛細血管の構造と機能の変化を脳内吸収指数 (brain uptake index, BUI) 法と電子顕微鏡により検索した。その結果、細胞外液の指標として用いた対照薬剤のシュクロース (sucrose) は腫瘍組織内に選択的に移行した。超微形態学的には脳腫瘍以外の組織の血管は、血液脳関門の構造を保っていたが、脳腫瘍では有窓形成や内皮細胞の不連続性、接合部の開大などが認められ血液脳関門は破綻していた。アドリアマイシン (adriamycin, ADM), ラニムスチン (1-(2-chloroethyl)-3-(methyl- α -D-glucopyranos-6-yl)-1-nitrosourea, MCNU), 5-フロロウラシル (5-fluorouracil, 5-FU), 塩酸ニムスチン (1-(4-amino-2-methylpyrimidine-5-yl)-methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride, ACNU) の4種類の抗癌剤の脳腫瘍組織への透過性を検討した結果、ADM, MCNU, 5-FU は脳腫瘍組織に選択的に移行し、このうち 5-FU は腫瘍細胞膜での透過性が高く腫瘍細胞内にも移行した。ACNU は血液脳関門を透過し、脳腫瘍以外の組織に移行していた。以上の結果は、抗癌剤の脳腫瘍への透過性は、血液脳関門ではなく腫瘍細胞膜により制限されていることを示している。したがって、本モデルを用いた薬物動態学的研究により、抗癌剤を脳腫瘍に選択的に送達させるためには、正常の血液脳関門は透過せず腫瘍細胞膜を選択的に透過し得る 5-FU のような性状を持った抗癌剤を用いるべきであることを示唆している。

Key words blood-brain barrier, brain uptake index, chemotherapy, 9L glioma

近年、外科的治療、放射線療法、化学療法ならびに免疫療法などを集学的に施行することにより、悪性腫瘍の治療成績は飛躍的に向上しているが、悪性脳腫瘍の治療成績は期待された程には向上していない¹⁾。化学療法においては、感受性のある抗癌剤を殺細胞濃度で腫瘍細胞に到達させることが必須であるが、脳腫瘍においては血液から脳組織への薬剤の移行を制限する血液脳関門が存在するため、これは必ずしも容易ではない。

血液脳関門については、Reese ら²⁾が西洋わさびペルオキシダーゼをトレーサーとして電子顕微鏡で観察し、その本体が脳毛細血管内皮細胞にあることを初めて証明した。脳毛細血管内皮細胞は超微形態学的に、内皮細胞が互いに密着帯 (tight junction) で接合していること、胞体内の飲み込み小胞 (pinocytotic vesicle) がきわめて少ないこと、有窓 (fenestration) 形成が存在しないこと、および血管周囲がグリア細胞の終足により覆われていることなどが特徴とされている³⁾。グリア細胞は血液脳関門としての構造と機能を維持するために重要な役割をはたしているとされている⁴⁾。機能的には、血液脳関門を通過し得る物質は脂溶性の高いもの、ブドウ糖やアミノ酸など何らかの輸送担体が関与するものに制限されている⁵⁾。すなわち、ヘキソース、単カルボキシル酸、中性アミノ酸、アミ

ン、塩基性アミノ酸、ヌクレオシド、プリン塩基、甲状腺ホルモンなどに関して少なくとも8種類の異なる輸送系があるとされている⁶⁾。

一方、種々の病態で血液脳関門は容易に破綻するとされており⁷⁾、脳腫瘍でも脳毛細血管の構造と機能の変化についてはいくつかの報告^{8)~14)}があるものの、脳腫瘍内血管の透過性に関しては不明な点が多い。

現在、血液脳関門に抗して脳腫瘍に抗癌剤を送達させるため、脂溶性のカムスチン (1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, BCNU), ロムスチン (1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea, CCNU), セムスチン (1-(2-chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea, methyl-CCNU) などのニトロソウレア系の薬剤が悪性脳腫瘍に対してはよく用いられている¹⁵⁾¹⁶⁾が、これらの薬剤は血管から離れた腫瘍細胞に薬剤が十分到達し得ないという欠点を持っている¹⁶⁾。一方、マニトールなどの高張液を用いて脳毛細血管の薬剤透過性を人工的に高めようとする試みもなされている^{17)~22)}が、薬剤が正常脳組織に移行することによる神経毒性の発現が懸念される。したがって、腫瘍部位以外の正常脳組織には移行せず、脳腫瘍にのみ選択的に移行し得る抗癌剤を用いれば、効果と副作用の両面から理想的な化学療法

平成5年8月2日受付, 平成6年4月26日受理

Abbreviations: ACNU, 1-(4-amino-2-methylpyrimidine-5-yl)-methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride; ADM, adriamycin; BCNU, 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea; BUI, brain uptake index; CCNU, 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea; 5-FU, 5-fluorouracil; methyl-CCNU, 1-(2-chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-

が行えると考えられる。

本研究では 9L グリオーマを脳腫瘍のモデルとして用い、脳腫瘍における毛細血管の構造と機能の変化を脳内吸収指数 (brain uptake index, BUI) 法^{23,24)}と電子顕微鏡を用いて検索し、その結果に基づき脳腫瘍に選択的に抗癌剤の送達を行うには、抗癌剤にどのような性質が必要であるかについて検討した。

材料および方法

I. 実験動物

雄性のフィッシャー系ラット (7 週齢, 体重 180–220g) (日本チャールズリバー社, 厚木) を用い、金沢大学動物実験施設内の空調飼育室 (室温 23±2℃, 湿度 55±5%) で、餌と水を自由に与えて飼育した。

II. 試 薬

本研究では放射性標識化合物としては、¹⁴C-シュクロース (¹⁴C-sucrose) (5.0mCi/mmol) (New England Nuclear, Boston, U.S.A.), ³H-水 (³H-water) (1.0mCi/g) (New England Nuclear), N-1-¹⁴C-ブタノール (N-1-¹⁴C-butanol) (1.1mCi/mmol) (New England Nuclear), ³H-5-フロウラシル (³H-5-fluorouracil, ³H-5-FU) (19.3Ci/mmol) (New England Nuclear), ¹⁴C-塩酸ニムスチン (¹⁴C-1-(4-amino-2-methyl pyrimidine-5-yl)-methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride, ¹⁴C-ACNU) (27μCi/mg) (三共, 東京), ¹⁴C-ラニムスチン (¹⁴C-1-(2-chloroethyl)-3-(methyl-α-D-glucopyranos-6-yl)-1-nitrosourea, ¹⁴C-MCNU) (45μCi/mg) (東京田辺, 東京) を使用した。非標識化合物としては、アドリアマイシン (adriamycin, ADM) (協和発酵, 東京) を使用した。

III. 細胞の移植²⁵⁾

10% 非働ウシ胎児血清 (fetal calf serum, FCS) (GIBCO, Grand Island, USA) を含む RPMI1640 培地 (日本製薬, 東京) にて、培養したラット 9L グリオーマ細胞²⁶⁾を 3×10⁷/ml に調製し、等量の 1% の寒天を含む培地を加え、1.5×10⁷/ml の細胞浮遊液を作製した。対照として、0.5% の寒天を含む培地を使用した。ラットを塩酸ケタミン (8mg/100g, 筋注) にて麻酔後、定位脳手術装置に固定し、冠状縫合上で矢状縫合より 3mm の位置に直径 1.5mm の穿頭を行い、右尾状核一被殻部に 10μl の 9L グリオーマ細胞浮遊液 (1.5×10⁶ cells) を約 30 秒かけて移植した。対照群には同量の 0.5% の寒天を含む RPMI1640 培地を注入した。

IV. 脳腫瘍内の毛細血管の透過性に関する実験

1. BUI 法

1) BUI 法 (図 1)

Oldendorf ら^{23,24)}の方法にしたがった。

移植 14 日目のラットを塩酸ケタミン (23.5mg/100g, 筋注) とキシラジン (2.3mg/100g, 筋注) にて麻酔後、右総頸動脈を露出した。基質として ¹⁴C-シュクロース (100μCi/ml) を、基準物質として ³H-水 (50μCi/ml) を含むリンゲルの HEPES 緩衝液 (pH7.4) を作製した。このリンゲルの HEPES 緩衝液 200μl をラットの総頸動脈内に瞬時 (0.5 秒以内) に投与し、5 秒後に断頭し右大脳半球を摘出した。この時間は注入された物質が脳内を 1 回循環するには十分な時間であるが、物質が脳から逆流したり、脳内を 2 回循環するには短い時間である。摘出した脳

は腫瘍、皮質、海馬、間脳の部位に分け、粉碎した後、それぞれ 1.5ml のプロトゾール (New England Nuclear) を加えた。一方、脳を一塊として定量するときは粉碎した後、2 本のバイアルに分注し、それぞれ 1.5ml のプロトゾールを加えた。60℃ で 3 時間振盪し、組織を可溶化した後、30% 過酸化水素水を 300μl 加え、室温で 15 分間静置した。その後、60℃ で 30 分間加熱し、室温にて冷却後、液体シンチレーションカクテルクリアゾル I (半井化学, 京都) を 10ml, 100% 酢酸を 64μl 加え、液体シンチレーションカウンタ LSC-671 (Aloka, 東京) で ³H と ¹⁴C と放射活性を測定した。

2) 解析法

BUI 値は次の式で計算した。

$$BUI(\%) = \frac{Ct, d/Ct, r}{Ci, d/Ci, r} \times 100$$

Ct, d: 基質の脳内の放射活性 (dpm/脳)

Ct, r: 基準物質の脳内の放射活性 (dpm/脳)

Ci, d: 基質の薬液中の放射活性 (dpm/薬液)

Ci, r: 基準物質の薬液中の放射活性 (dpm/薬液)

2. 脳毛細血管内容積の測定

1) 赤血球の⁵¹Cr 標識方法

ラット総頸動脈より採血した血液に 1/7 容積のクエン酸デキストロース溶液 (acid-citrate-dextrose solution, ACD solution) (pH5.0) を加え攪拌し、1500rpm で 15 分間遠心した。上清を捨て、得られた赤血球に等量の 0.1M リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH7.4) を加え攪拌し、同様に遠心した。この洗浄操作をもう一度繰り返した。上清を捨て、得られた赤血球分画 100μl に対し Na₂⁵¹CrO₄ (376.39mCi/mgCr) (New England Nuclear) が 10μCi になるように加えて攪拌し、37℃ で 30 分間静置した。PBS を加え攪拌し、1500rpm で 15 分間遠心した。上清と赤血球分画とに分け、上清の放射能活性が赤血球分画の 1% 以下になるまで同様の操作を繰り返した。最後に赤血球と等量のリンゲルの HEPES 緩衝液を加えて 4℃ で保存した。

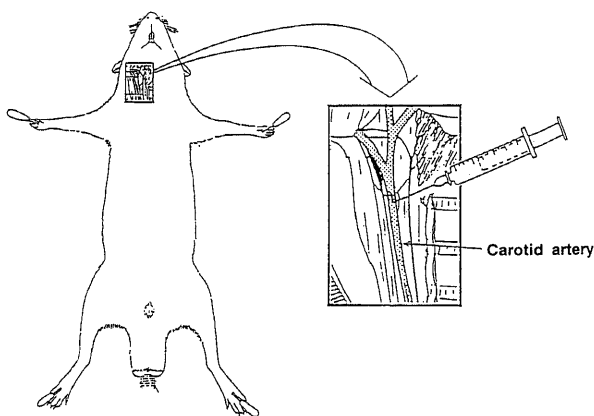


Fig. 1. Schematic representation of injection procedure of a mixture of ¹⁴C-labeled substance and ³H-labeled substance into the rat common carotid artery for brain uptake index (BUI).

1-nitrosourea; MCNU, 1-(2-chloroethyl)-3-(methyl-α-D-glucopyranos-6-yl)-1-nitrosourea; PBS, phosphate buffered saline

2) 血管内容積の測定方法

ラットの大動脈と大腿静脈にカニューレを挿入し、大腿静脈より ^{51}Cr 標識赤血球 ($100\mu\text{Ci/ml}$) を $300\mu\text{l}$ 投与した。投与 4 分 30 秒後に動脈側のカニューレより採血し、投与 5 分後に断頭した。脳を取り出し、腫瘍、海馬、皮質、間脳に分け、それぞれの重量を測定し、 γ カウンターで ^{51}Cr 標識赤血球の放射活性を測定した。同時に採取した血液の放射活性も測定した。血管内容積の算出には下記の式を使用した。

$$\text{血管内容積 } (\mu\text{g}) = \frac{\text{組織中の } ^{51}\text{Cr} \text{ のカウント} \div \text{組織重量}}{\text{血液中の } ^{51}\text{Cr} \text{ のカウント} \div \text{測定血液量}}$$

3. 血流速度の測定方法

血流速度の測定は、Pardridge ら²⁷⁾の方法に従った。基質として、血液脳関門を瞬時に透過するブタノールを用いた。BUI 法を用いて、投与後 5, 15, 30, 45, 60 秒における組織重量当たりの脳内残存量を測定した。その結果を片対数用紙を用いて横軸に時間を取り、縦軸に組織重量当たりの脳内残存量を取りプロットした。グラフの傾きと Y 切片から血流速度を次式により算出した。

$$\text{血流速度 } (\text{ml/min/g}) = \frac{2.30 \times \text{Kb} \times \text{V}'}{\text{E} (0)}$$

Kb: グラフの傾き

V': 脳血液分配係数 ($0.8^{27})/\text{g}$ 脳)

E (0): グラフの Y 切片

4. 電子顕微鏡による観察

ラットを塩酸ケタミン-キシラジン液で麻酔後、総頸動脈より 0.1M カコジル酸バッファーにて溶解した 2.5% グルタルアルデヒド約 1ml を 1 分間かけて灌流固定した後、腫瘍と脳を摘出し同固定液で 2 時間浸漬固定し、さらに 1% オスミウム酸で 1 時間固定した。エタノール系列で脱水しエボンとアララルダイドで包埋し、LKB ミクロトームを用いて作製した超薄切片に酢酸ウラニールと硝酸鉛の二重染色を施し、電子顕微鏡 H-600 型 (日立製作所、東京) で観察した。

V. 抗癌剤の脳腫瘍選択的送達に関する実験

1. BUI 法

1) BUI 法

先に述べた方法に従った。

基質としては、 ^{14}C -ACNU ($10\mu\text{Ci/ml}$)、 ^{14}C -MCNU ($10\mu\text{Ci/ml}$)、 ^3H -5-FU ($50\mu\text{Ci/ml}$) を用いた。一方、基準物質としては基質の放射性核種が ^3H 体のときは ^{14}C -ブタノール ($0.2\mu\text{Ci/ml}$) を、基質の放射性核種が ^{14}C 体のときは ^3H -水 ($50\mu\text{Ci/ml}$) を含むリンゲルの HEPES 緩衝液を用いた。これらのリンゲルの HEPES 緩衝液 $200\mu\text{l}$ をラットの総頸動脈内に注入した。ADM はリンゲルの HEPES 緩衝液で 2mg/ml となるように調製し、 $200\mu\text{l}$ を同様に頸動脈内に注入した。

2) ADM の定量

ADM の定量は、Richard ら²⁸⁾の方法に従った。

BUI 法を行った後、摘出した組織 400mg に対し、 50mM トリス HEPES 緩衝液 ($\text{pH}7.4$) を 1.6ml 加えホモジナイズし、内部標準物質としてダウノマイシン 200ng を加え攪拌し 4°C で 30 分間静置した。クロロホルム-イソプロパノール溶液 (1:1) を 8ml 、硫酸アンモニウムを 1.4g 加え、 4°C で 10 分間静置後、 20 分間振盪した。 4°C で 30 分間静置し、 3000rpm 、 4°C で 5

分間遠心し、クロロホルム-イソプロパノール層を 3ml 分取し蒸発させ、メタノール $100\mu\text{l}$ に溶解し、 $50\mu\text{l}$ を測定に用いた。蛍光検出器 RF535 (島津製作所、京都) を装備した高速液体クロマトグラフィー SCL-6A (島津製作所) に注入し、ADM 含量を測定した。移動相は 28% アセトニトリル- 10mM リン酸 ($\text{pH}2.3$) で 1 分間に 1ml の速度で流し、検出は励起波長 465nm 、蛍光波長 580nm にて行った。カラムはステンレス製カラム ($4.6 \times 150\text{mm}$) に TSK ゲル ODS-80TM を充填した ODS カラムを使用した。なお、検量線の作成には、脳組織 400mg に対し、 50mM トリス HEPES 緩衝液 ($\text{pH}7.4$) を 1.6ml 加え粉碎した後、 $5.00\mu\text{g/ml}$ 、 $10.0\mu\text{g/ml}$ 、 $20.0\mu\text{g/ml}$ 、 $50.0\mu\text{g/ml}$ 、 $100\mu\text{g/ml}$ の ADM 溶液をそれぞれ $20\mu\text{l}$ ずつ加え、さらに $10\mu\text{g/ml}$ のダウノマイシン溶液を $20\mu\text{l}$ ずつ加え攪拌し、 4°C で 30 分間静置した。以下、上記と同様の操作を行った。

3) 解析法

抗癌剤の透過性を評価する場合は、基準物質の違いによって影響されない基質の脳抽出率を用いた。

$$\text{BUI } (\%) = \frac{\text{Ct, d/Ct, r}}{\text{Ci, d/Ci, r}} \times 100 = \text{Etest/Eref} \times 100$$

Etest: 脳内の基質の抽出率

Eref: 脳内の基準物質の抽出率

式を変形して

$$\text{Etest} = \text{BUI} \times \text{Eref} / 100$$

なお、Eref は次の式によって求めた。

$$\text{Eref } (t, \text{min}) = \text{Eref, max} \times e^{-\text{kb} \times t}$$

Eref (t, min): ある時間 (分) における脳内の基準物質の抽出率

Eref, max: 脳内の基準物質の抽出率の最大値

kb: 基準物質の脳から血液への逆流定数

VI. 統計学的検討法

各測定値は平均土標準誤差で表わし、多群間の平均値の有意差検定には、Kruskal-Wallis の一元配置分散分析後、Hollander and Wolfe の多重比較法または、二元配置分散分析後、Tukey-Kramer の多重比較法を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

成 績

I. 9L グリオーマラットについての検討

脳内に 9L グリオーマ細胞を移植後 2 週間経過したラットの脳腫瘍は、重量が約 200mg であり、大脳半球内において肉眼的に観察可能な大きさにまで成長していた (図 2)。髄膜組織やクモ膜下腔への浸潤は認められず、どのラットもほぼ同じ脳腫瘍重量を示していた。この時点で、9L グリオーマラットはその外見上および行動様式において正常ラットと比較して特記すべき差異を示さなかった。

II. 脳腫瘍内の毛細血管の透過性について

1. 各ラットにおける脳のシュクロースの BUI 値の比較

正常ラットの脳におけるシュクロースの BUI 値は $3.34 \pm 0.35\%$ 、偽手術ラットでは $3.55 \pm 0.54\%$ で両群間に有意差はなく、9L グリオーマラットでは $19.11 \pm 1.72\%$ で前二者と比較して有意に増加していた ($p < 0.01$) (図 3)。

2. 脳腫瘍重量とシュクロースの BUI 値の関係

脳腫瘍重量とシュクロースの BUI 値には相関係数 0.94 の高い正の相関関係がみられた (図 4)。

3. 各組織におけるシュクロースの BUI 値の比較

9L グリオーマラットの脳を脳腫瘍、海馬、皮質、間脳の各部位に分割して、それぞれのシュクロースの BUI 値を測定した。脳腫瘍、海馬、皮質、間脳の BUI 値はそれぞれ $34.37 \pm 2.71\%$, $6.74 \pm 1.12\%$, $6.41 \pm 0.65\%$, $7.08 \pm 0.54\%$ であり、海馬、皮質、間脳の BUI 値には有意差はなく、脳腫瘍部位では BUI 値が有意に増加していた ($p < 0.05$) (図 5)。

4. 各組織における毛細血管内容積の比較

偽手術ラットの間脳、皮質の毛細血管内容積はそれぞれ $6.85 \pm 0.66 \mu\text{L/g}$, $6.31 \pm 0.31 \mu\text{L/g}$ であるのに対し、9L グリオーマラットの間脳、皮質、脳腫瘍の各部位の毛細血管内容積はそれぞれ $7.17 \pm 0.74 \mu\text{L/g}$, $6.72 \pm 0.53 \mu\text{L/g}$, $7.20 \pm 0.47 \mu\text{L/g}$ であり、各部位の毛細血管内容積に有意差はみられなかった (図 6)。

5. 各組織における毛細血管の血流速度の比較

9L グリオーマラットにおける脳腫瘍、海馬、皮質、間脳の各部位の毛細血管の血流速度は、それぞれ $1.30 \pm 0.07 \text{ ml/min/g}$, $0.75 \pm 0.01 \text{ ml/min/g}$, $0.80 \pm 0.04 \text{ ml/min/g}$, $0.57 \pm 0.07 \text{ ml/min/g}$



Fig. 2. The coronal section of the rat brain 14 days after the inoculation of 9L glioma cells showing an expanding tumor (arrowheads) in the hemisphere.

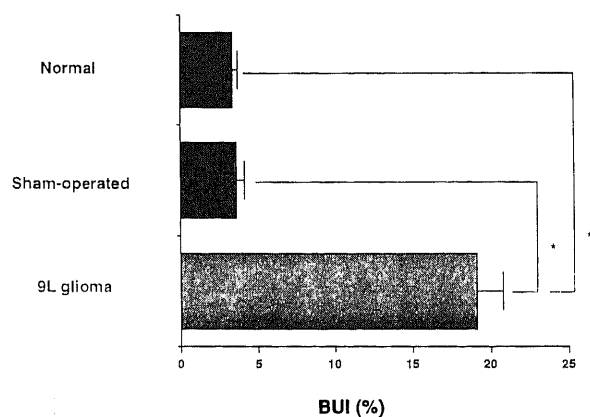


Fig. 3. Comparison of BUI (%) of sucrose among normal, sham-operated and 9L glioma rat brains. Tumor weight was $246 \pm 8 \text{ mg}$. Each value shows mean \pm SEM of 4-15 samples. Asterisks indicate a significant difference in BUI (%) between 9L glioma and control or sham-operated brains ($p < 0.01$, by Hollander and Wolfe's multiple comparison).

g であり、脳腫瘍部位で有意に高く、脳腫瘍、皮質、海馬、間脳の順に低くなった ($p < 0.05$) (図 7)。ここで、頸動脈に投与 5 秒後のブタノールの脳腫瘍、海馬、皮質、間脳の抽出率を血流速度より求めると、それぞれ 97.7%, 104.3%, 75.4%, 65.7% であった。

6. 電子顕微鏡による毛細血管の構造の観察

腫瘍より離れた部位の脳組織では、毛細血管の内皮細胞は、密着した構造 (tight junction) を示し、基底膜が周囲をとり巻き、その外側にはアストロサイトの終足が存在していた (図 8 A)。一方、腫瘍血管の内皮細胞では胞体の膨化、有窓 (fenestration) の形成 (図 8 B)、内皮細胞の不連続性 (図 8 C)、

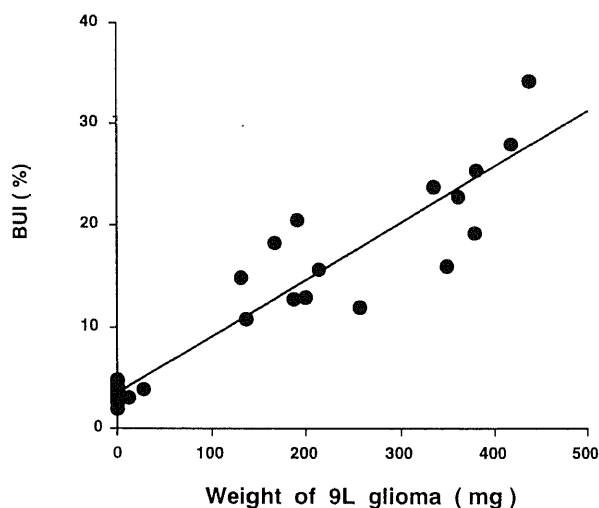


Fig. 4. Correlation between 9L glioma weight and BUI (%) of sucrose. Zero mg of the tumor weight represents BUI (%) of brains of normal and sham-operated rats. 9L glioma was examined at 14-17 days after inoculation. The solid line was obtained by the linear regression analysis for all data ($r = 0.94$).

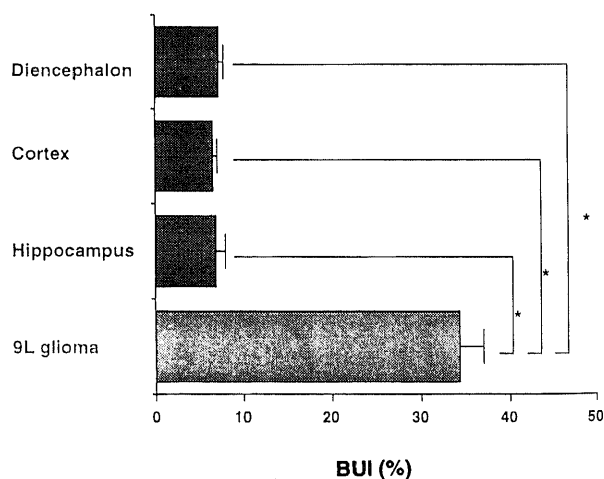


Fig. 5. Comparison of BUI (%) of sucrose among diencephalon, cortex, hippocampus and 9L glioma in rats. Tumor weight was $198 \pm 4 \text{ mg}$. Each value shows mean \pm SEM of 4-15 samples. Asterisks indicate a significant difference in BUI (%) of 9L glioma from diencephalon, cortex or hippocampus ($p < 0.01$, by Hollander and Wolfe's multiple comparison).

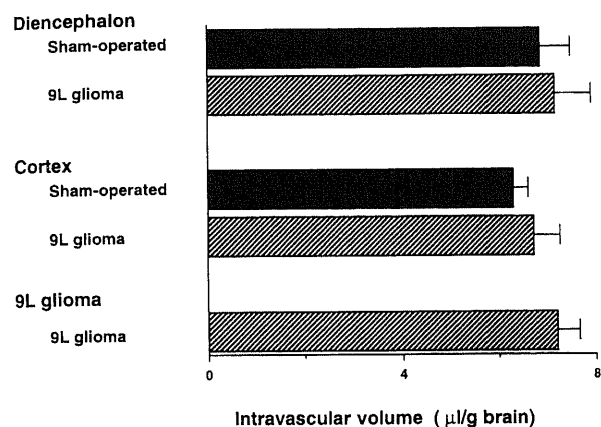


Fig. 6. Comparison of intravascular volume evaluated by ^{51}Cr -labeled red blood cells in diencephalon, cortex and 9L glioma in rats. Tumor weight was 230 ± 47 mg. Each value shows mean \pm SEM of 4-15 samples. No significant differences were seen among each value (by Tukey-Kramer's multiple comparison).

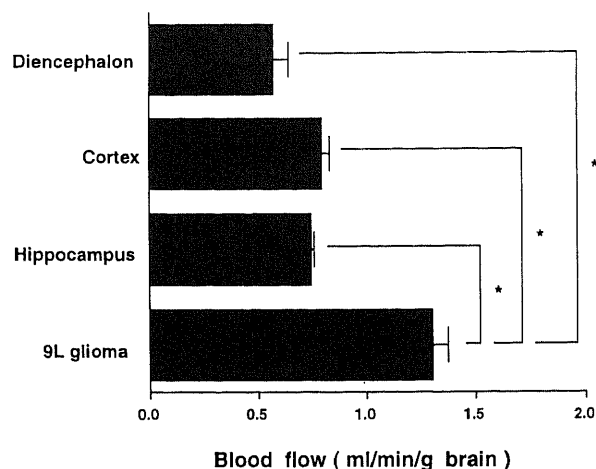


Fig. 7. Comparison of regional blood flow in diencephalon, cortex, hippocampus and 9L glioma in rats. Tumor weight was 201 ± 12 mg. Each value shows mean \pm SEM of 14 samples. Asterisks indicate a significant difference in blood flow of 9L glioma from diencephalon, cortex or hippocampus ($p < 0.05$, by Hollander and Wolfe's multiple comparison).

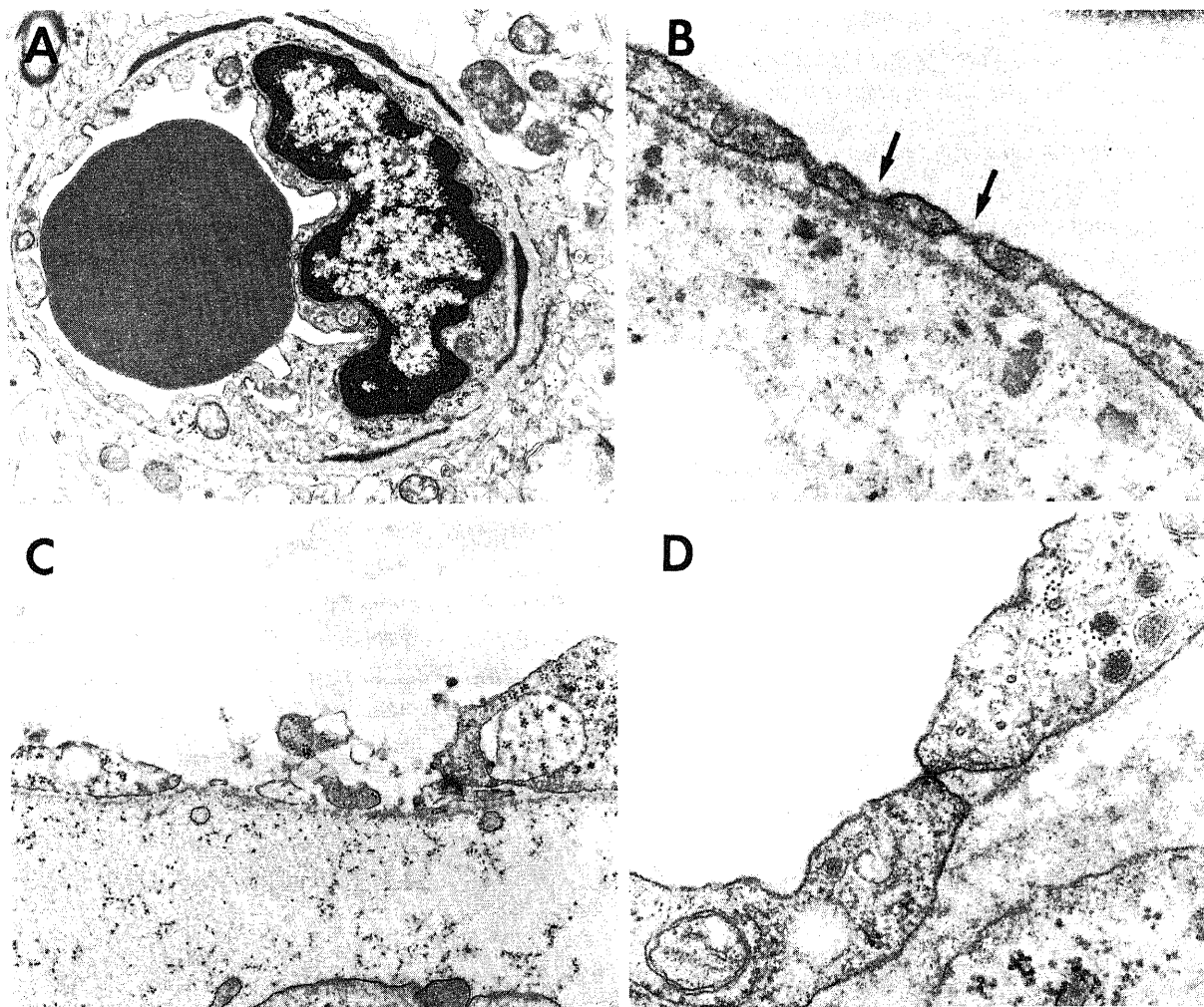


Fig. 8. Ultrastructural findings of the capillary endothelium in the normal brain and 9L glioma. A: The normal brain has nonfenestrated endothelial cells. $\times 14,400$. B: The endothelial cell within 9L glioma shows numerous fenestrations (arrows). $\times 60,000$. C: The endothelial cells within 9L glioma show discontinuity of cytoplasmic processes. $\times 20,400$. D: The endothelial cells within 9L glioma show disruption of cell junction. $\times 20,400$.

および接合部 (junction) の開大 (図 8 D) などが認められた。

Ⅲ. 抗癌剤の脳腫瘍選択的送達についての検討

1. 9L グリオーマラットと偽手術ラットにおける脳の各抗癌剤の抽出率の比較 (図 9)

偽手術ラットにおける ADM, MCNU, ACNU, 5-FU, シュクロースの抽出率は, それぞれ $2.20 \pm 0.32\%$, $3.20 \pm 0.27\%$, $7.29 \pm 1.43\%$, $2.36 \pm 0.23\%$, $2.14 \pm 0.21\%$ であった. すなわち, ACNU の抽出率はシュクロースに比べて有意に高く ($p < 0.05$), 他の抗癌剤の抽出率はシュクロースと有意差はなかった. 9L グリオーマラットにおける ADM, MCNU, ACNU, 5-FU, シュクロースの抽出率は, それぞれ $6.63 \pm 1.74\%$, $8.66 \pm 0.55\%$, $18.63 \pm 1.92\%$, $18.35 \pm 1.21\%$, $9.06 \pm 0.97\%$ であり, ACNU と

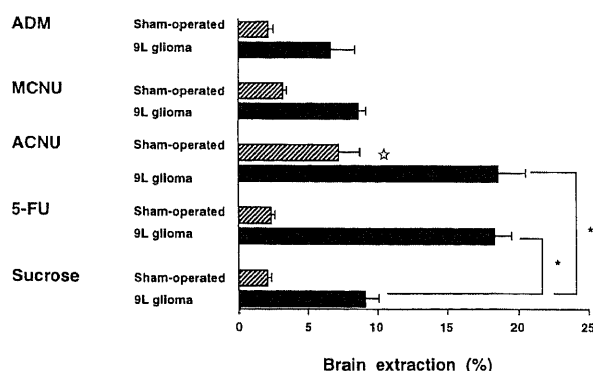


Fig. 9. Comparison of brain extraction (%) of various anticancer drugs between sham-operated and 9L glioma rats. Tumor weight was 174 ± 28 mg (ADM), 159 ± 39 mg (MCNU), 191 ± 13 mg (ACNU), 193 ± 40 mg (5-FU) and 198 ± 1 mg (sucrose), respectively. Each value shows mean \pm SEM of 3-6 samples. The brain extractions of all anticancer drugs in 9L glioma rats are significantly higher than those of sham-operated rats ($p < 0.05$). The brain extraction of ACNU in sham-operated rats is significantly higher than that of sucrose in sham-operated rats ($\star p < 0.05$). Asterisks indicate a significant difference in the brain extraction in 9L glioma rats of ACNU and 5-FU from sucrose ($p < 0.01$, by Tukey-Kramer's multiple comparison).

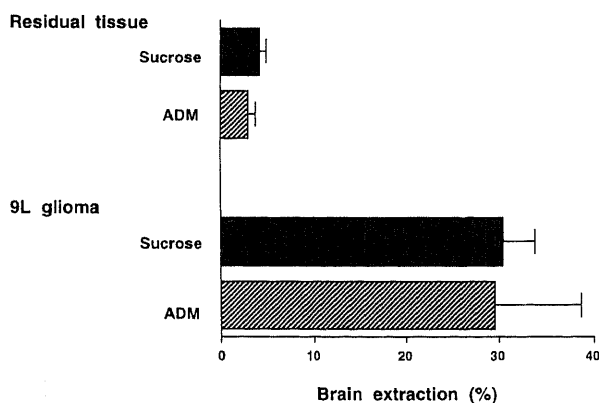


Fig. 10. Comparison of brain extraction (%) of sucrose and ADM between normal brain and 9L glioma. Tumor weight was 192 ± 6 mg (sucrose) and 174 ± 28 mg (ADM). Each value shows mean \pm SEM of 4 samples. The extraction of ADM in 9L glioma is significantly higher than that of hippocampus, cortex or midbrain ($p < 0.01$, by Tukey-Kramer's multiple comparison).

5-FU の抽出率はシュクロースに比べて有意に高かった ($p < 0.05$).

2. 抗癌剤の脳腫瘍と脳組織における抽出率の比較

1) ADM (図10)

腫瘍組織における ADM の抽出率は $29.53 \pm 9.14\%$ であるのに対し, 腫瘍以外の脳組織の抽出率は $2.97 \pm 0.75\%$ であり, 腫瘍組織の抽出率が有意に高かった ($p < 0.01$). また, シュクロースの腫瘍組織, 腫瘍以外の脳組織の抽出率は, それぞれ $30.3 \pm 3.4\%$, $4.16 \pm 0.78\%$ であり, 各組織において ADM とシュクロースの抽出率には有意差はなかった.

2) MCNU (図11)

腫瘍, 海馬, 皮質, 間脳における MCNU の抽出率は, それぞれ $28.39 \pm 4.41\%$, $4.96 \pm 0.46\%$, $4.27 \pm 0.54\%$, $3.67 \pm 0.43\%$ であり, 腫瘍の抽出率は海馬, 皮質, 間脳に比べて有意に高かった

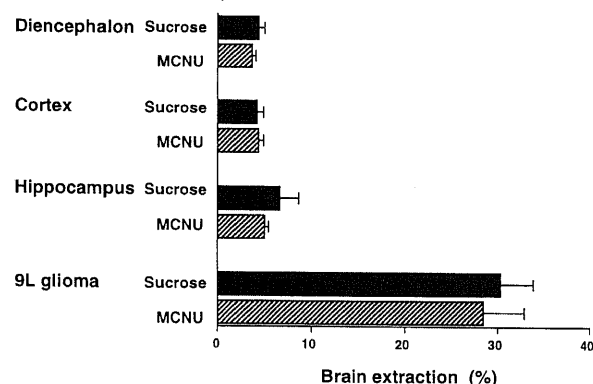


Fig. 11. Comparison of brain extraction (%) of sucrose and MCNU among diencephalon, cortex, hippocampus and 9L glioma. Tumor weight was 192 ± 6 mg (sucrose) and 159 ± 39 mg (MCNU). Each value shows mean \pm SEM of 3-4 samples. The extraction of MCNU in 9L glioma is significantly higher than that of diencephalon, cortex or hippocampus ($p < 0.01$, by Tukey-Kramer's multiple comparison).

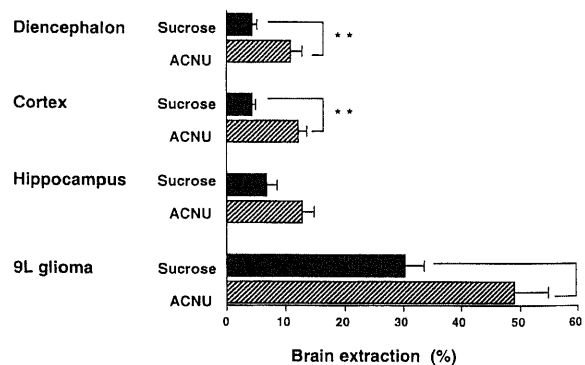


Fig. 12. Comparison of brain extraction (%) of sucrose and ACNU among diencephalon, cortex, hippocampus and 9L glioma. Tumor weight was 192 ± 6 mg (sucrose) and 191 ± 13 mg (ACNU). Each value shows mean \pm SEM of 4-6 samples. The extraction of ACNU in 9L glioma is significantly higher than that of diencephalon, cortex or hippocampus ($p < 0.01$). Asterisks indicate a significant difference in the extraction of ACNU from sucrose ($\star p < 0.01$, $\star\star p < 0.05$, by Tukey-Kramer's multiple comparison).

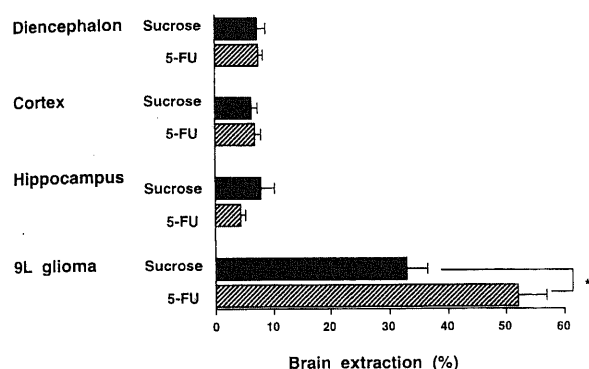


Fig. 13. Comparison of brain extraction (%) of sucrose and 5-FU among diencephalon, cortex, hippocampus and 9L glioma. Tumor weight was 192 ± 6 mg (sucrose) and 193 ± 40 mg (5-FU). Each value shows mean \pm SEM of 4-6 samples. The extraction of 5-FU in 9L glioma is significantly higher than that of diencephalon, cortex or hippocampus ($p < 0.01$). Asterisks indicate a significant difference in the extraction of 5-FU from sucrose ($p < 0.01$, by Tukey-Kramer's multiple comparison).

($p < 0.01$). また、腫瘍、海馬、皮質、間脳におけるシュクロースの抽出率は、それぞれ $30.29 \pm 3.45\%$, $6.69 \pm 1.9\%$, $4.16 \pm 0.74\%$, $4.25 \pm 0.78\%$ であり、各組織において MCNU とシュクロースの抽出率には有意差はなかった。

3) ACNU (図12)

腫瘍、海馬、皮質、間脳における ACNU の抽出率は、それぞれ $48.97 \pm 5.7\%$, $12.67 \pm 2.12\%$, $12.18 \pm 1.36\%$, $10.86 \pm 1.83\%$ であり、腫瘍の抽出率は海馬、皮質、間脳に比べて有意に高かった ($p < 0.01$)。また、腫瘍、海馬、皮質、間脳におけるシュクロースの抽出率は、それぞれ $30.29 \pm 3.45\%$, $6.69 \pm 1.9\%$, $4.16 \pm 0.74\%$, $4.25 \pm 0.78\%$ であり、腫瘍、皮質、間脳において ACNU の抽出率がシュクロースより有意に高かった ($p < 0.05$)。

4) 5-FU (図13)

腫瘍、海馬、皮質、間脳における 5-FU の抽出率は、それぞれ $52.0 \pm 4.83\%$, $4.41 \pm 0.78\%$, $6.93 \pm 0.96\%$, $7.48 \pm 0.93\%$ であり、腫瘍の抽出率は海馬、皮質、間脳に比べて有意に高かった ($p < 0.01$)。また、腫瘍、海馬、皮質、間脳におけるシュクロースの抽出率は、それぞれ $30.3 \pm 3.45\%$, $6.69 \pm 1.90\%$, $4.16 \pm 0.74\%$, $4.25 \pm 0.78\%$ であり、腫瘍部位のみ 5-FU の抽出率がシュクロースに比べて有意に高く ($p < 0.01$)、海馬、皮質、間脳においては 5-FU とシュクロースの抽出率に有意差はなかった。

考 察

脳腫瘍のみならず脳梗塞、脳出血、高血圧、痙攣発作、脳挫傷、炎症などの種々の病態で血液脳関門は容易に破壊するとされている⁷⁾。しかし、脳腫瘍においては、脳腫瘍部位の毛細血管は血液脳関門としての機能が保たれていないというものと、保たれているという相反する報告があり、一致した見解が得られていない。Yamada ら⁸⁾は、エチルニトロソウレアで誘発したラット脳腫瘍内の毛細血管は血液脳関門として機能していないが、脳腫瘍が小さい時にはその機能が保たれていること、腫瘍が大きい時には腫瘍周囲の組織の透過性も亢進していることを

報告した。また、Blasberg ら⁹⁾は同じ発癌ラットにおいて、腫瘍の大小にかかわらず血液脳関門は保たれていると報告した。Nir ら¹⁰⁾は同様のラット脳腫瘍において、腫瘍組織の透過性は亢進しているが周辺部より中心部の透過性の亢進が著明であること、および腫瘍細胞が迷入している周囲脳では透過性は亢進していないことを報告した。Stewart ら¹¹⁾はラット C6 グリオーマにおいて、腫瘍部位の毛細血管は血液脳関門として働いていないが、腫瘍に近接した脳では血液脳関門が保たれていることを報告した。Hasegawa ら¹²⁾は Walker 256 癌細胞を転移させたラット転移性脳腫瘍においては、腫瘍が大きくなるにつれて透過性は増大するが、腫瘍周囲の組織の透過性はわずかしこ亢進しないことを報告した。さらに、Sage¹³⁾はヒトの良性グリオーマにおいては血液脳関門が保たれているが、悪性グリオーマや転移性脳腫瘍では保たれていないことを報告した。柴田¹⁴⁾はヒト脳腫瘍毛細血管を超微形態学的に観察した結果、グリア由来の腫瘍では無窓血管が、非グリア性腫瘍や転移性脳腫瘍では有窓血管が見られることから、血液脳関門の欠如の原因は有窓血管にあるとした。以上より、脳腫瘍における血液脳関門の構造と機能はグリオーマとグリオーマ以外の脳腫瘍とで異なるのみならず、グリオーマの中でも症例により、また同一の腫瘍でも部位によってその破壊の程度は異なると推定される。

現在、血液脳関門に抗して脳腫瘍細胞内に抗癌剤を到達させるため、BCNU, CCNU, メチル-CCNU などの脂溶性の高いニトロソウレア系薬剤が頻用され¹⁵⁾¹⁶⁾、一方では、脳毛細血管の透過性を人工的に高めようとする工夫^{17)~22)}がなされている。脂溶性薬剤は血中から組織への透過性が高いと同時に組織から血中への透過性も大きく、さらに細胞内に取り込まれて不活化される割合も大きいことより、血管から離れた腫瘍細胞に薬剤が十分に到達し得ないという欠点を持っている¹⁸⁾。Levin ら¹⁹⁾は、9L グリオーマラットを用いてニトロソウレア系薬剤の log P 値 (分配係数: オクタノールと水への親和性の比, 0.37-3.3) と治療効果の相関を検討し、log P 値が 0.37 に近づくほど、すなわち脂溶性であっても水への親和性が高いもののほどグリオーマに対する抗腫瘍効果が大きくなることを報告した。

脳毛細血管の透過性を人工的に高めようとする試みは、Rapoport ら¹⁷⁾が高張液の頸動脈内投与によりウサギの脳毛細血管内皮細胞の密着帯を一時的に開くことに成功したことに始まり、ヒトにおいても、マニトールを頸動脈内に投与すると血液脳関門が一時的に開くことが報告されている¹⁸⁾。超微形態学的には、密着帯は保たれているものの、毛細血管内皮細胞内の空胞形成とグリア細胞の胞体の膨化を認め、これらの変化が動注後12時間持続することが報告されている¹⁹⁾。Hasegawa ら²⁰⁾は髄膜癌腫ラットにおいては、頸動脈内マニトール投与とメトトレキセートの静脈内投与を併用した群が後者のみの群に比べて生存期間が有意に延長することを報告した。一方、ラット脳腫瘍においては、腫瘍内血管の透過性の亢進と同時に正常脳毛細血管の透過性亢進や²¹⁾、神経細胞の変性の発生などが報告されている²²⁾。マニトールを併用した場合、水溶性の抗癌剤が大量に正常脳組織に移行するためその副作用が発現する可能性があり、この方法は脳腫瘍の化学療法に応用されるには至っていない。悪性脳腫瘍に対しては、正常脳組織に移行させることなく、脳腫瘍のみに選択的に抗癌剤を取り込ませることができれば、効率的かつ理想的な化学療法であると考えられる。

脳毛細血管の構造と機能の研究に関しては、電子顕微鏡によ

る超微形態像の観察²³⁾⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾や定量的オートラジオグラフィ⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹²⁾による観察が主としてなされている。電子顕微鏡を用いた毛細血管の観察では、構造の変化を定性的にとらえられるが、微視的であるため観察した部分が全体の状態を表わしていない可能性がある。一方、定量的オートラジオグラフィは脳内移行の度合いを微小区域に分けて観察することが可能であるため、測定部位を細かく設定できるという利点を持つが、トレーサーとして使用できるものは、いったん脳内に移行したものが血中に流出しない性質を持つものでなければならないという制約がある。これに対し、BUI 法²³⁾⁽²⁴⁾は、簡便で、代謝による影響がなく、毛細血管透過速度を定量的に評価でき、種々の薬物に応用可能な方法である。そこで、本研究では BUI 法を用いて、脳腫瘍における抗癌剤の脳内移行を定量的に検討した。

細胞外液の指標となるシュクロースは正常の細胞膜や密着帯を透過せず血管腔内にしか分布しないため、血管透過性を検索する際の指標としては理想的な物質である。そこで、本研究においては、¹⁴C-シュクロースを用いて毛細血管の透過性亢進の程度を測定した。正常ラット、9L グリオーマラット、および偽手術ラットの BUI 値を比較すると、9L グリオーマラットの BUI 値は他のラットに比べて著明に増加していた。この原因としては、移植手術により血液脳関門が破壊されたという実験手技上の問題と、9L グリオーマの増殖にともなう、脳毛細血管の構造と機能が大きく変化したという本質的な点の両者が考えられる。しかし、正常ラットと偽手術ラットの BUI 値には有意差がみられなかったことから判断すると、9L グリオーマラットにおけるシュクロースの BUI 値の増加は実験手技による脳毛細血管への障害によるものではなく、腫瘍の増殖に起因するものであることが示唆された。さらに、脳腫瘍重量とシュクロースの BUI 値には正の相関関係が認められたことから、シュクロースの BUI 値の増加の原因は脳腫瘍そのものにあることが明らかとなった。

ラットの脳を脳腫瘍、海馬、皮質、間脳の各部位に分割し、それぞれのシュクロースの BUI 値を比較すると、脳腫瘍においては、他の部位と比べて有意に増加していた。しかし、脳腫瘍に比較的近い部位にある間脳においては、シュクロースの BUI 値は皮質、海馬と比べて有意差はなかった。したがって、脳腫瘍に特異的にシュクロースの BUI 値の増加が起こっており、脳腫瘍周辺の脳内毛細血管の透過性は変化していないものと思われる。

脳腫瘍内においてシュクロースの BUI 値が増加した原因としては、以下の3者が推定された。すなわち、1. 脳毛細血管の透過性が亢進した。2. 毛細血管内容積が増加したために見かけ上シュクロースの分布が増加し、基質の BUI 値が増加した。3. 毛細血管の血流速度が変化したことにより、基準物質の量が減少し、見かけ上シュクロースの BUI 値が増加したなどである。そこで、毛細血管内容積に変化が生じているか否かを明らかにするために、脳毛細血管を透過できず、血管腔内にしか分布できない赤血球を用いて検討した。その結果、血管内容積には部位による有意差はなかった。毛細血管の血流速度は腫瘍部位において海馬、皮質、間脳のいずれの部位よりも有意に速かったが、血流速度より求められた基準物質の抽出率は各部位において大きな差は認められなかった。以上のことから、シュクロースの BUI 値の増加は毛細血管の透過性の亢進そのものに起因することが示唆された。

脳毛細血管の構造を電子顕微鏡で観察すると、腫瘍より離れた部位の脳組織では、内皮細胞は互いに密着した構造を示し、基底膜が周囲を取り巻き、その外側にはアストロサイトの終足が存在していた。これに対し、腫瘍血管の内皮細胞は胞体の膨化や有窓の形成、および不連続性などを示した。すなわち、本研究からは、腫瘍以外の脳毛細血管は血液脳関門の構造を保っているのに対し、腫瘍内の毛細血管は新生されたものであり、関門機構を持たない血管であることが示唆された。Hirano ら²⁶⁾は、ヒトの転移性脳腫瘍を超微形態学的に観察した結果、腫瘍血管には多数の有窓形成がみられたことより、腫瘍血管は腫瘍細胞の影響を受けて脳の正常毛細血管より誘導され大きく変化したものであることを示唆している。以上より、腫瘍部位でのシュクロースの BUI 値の増加は、腫瘍内毛細血管が関門構造を持たず、透過性の亢進を示した結果であることが示唆された。

9L グリオーマラットにおいては、循環血液中の抗癌剤は速やかに腫瘍内血管を透過し、脳腫瘍の組織間液中へと移行し得ると考えられる。この性質を利用し血液脳関門の透過性の劣る抗癌剤を用いれば、循環血液中の抗癌剤は正常脳には移行せず、脳腫瘍内の組織間液中にのみ移行するものと思われる。さらに、腫瘍細胞膜の透過性の良い抗癌剤を用いれば、腫瘍細胞内にも抗癌剤を送達し得ると思われる。これらのことを証明する目的で、本研究においては、5-FU、ADM、ACNU、MCNU の4つの抗癌剤を対象とし、BUI 法によりそれぞれの脳内移行性を検討した。5-FU は水溶性であるが分子量が 130Da と小さいため血液脳関門を中等度透過すると Levin ら³⁰⁾は報告した。一方、正常脳毛細血管にチミジン、ウラシルの担体はないとの報告³¹⁾⁽³²⁾があり、5-FU には脳毛細血管内皮細胞において輸送系は存在しないことが予想されるが、ヒトのヘパトーマ細胞ではピリミジン輸送系を介して担体輸送されているとの報告³³⁾がある。ADM は血液脳関門を通過しないとされている³⁴⁾⁽³⁵⁾が、エーリッヒ腹水癌細胞では担体輸送されていることが報告されている³⁶⁾。ACNU や MCNU は本邦で開発された薬剤で現在悪性脳腫瘍の化学療法に頻用されているが、いずれも血液脳関門を透過して髄液中へ移行することが証明されている³⁷⁾⁽³⁸⁾。

9L グリオーマと偽手術ラットにおける脳内移行性を比較すると、MCNU と ADM の抽出率は、両者いずれにおいてもシュクロースの抽出率と有意差がなかった。5-FU は偽手術ラットではシュクロースの抽出率と有意差を認めなかったが、9L グリオーマラットではシュクロースに比べて有意に高い抽出率が得られた。一方、ACNU は偽手術ラットと 9L グリオーマラットの両者ともにシュクロースの抽出率より有意に高い抽出率を示した。このことから、MCNU、ADM、5-FU は血液脳関門を透過しにくい、ACNU は脂溶性 (log P=0.92) であるため血液脳関門を透過していることが示唆され、BCNU (log P=1.53)、CCNU (log P=2.83)、メチル-CCNU (log P=3.3) などの脂溶性ニトロソウレアが血液脳関門を透過するという報告¹⁹⁾とよく一致していた。

9L グリオーマラットにおける抗癌剤の移行性を部位別に検討してみると、すべての抗癌剤は脳腫瘍において他の部位よりも高い抽出率を示した。しかし、ADM と MCNU は腫瘍ではシュクロースの抽出率と有意差を示さないことより、腫瘍細胞間液中には選択的に移行するが、腫瘍細胞内には移行していないことが示唆された。ACNU は腫瘍、皮質、海馬、間脳のすべ

てにおいて、シュクロースよりも高い抽出率を示し、腫瘍内のみならず正常脳内へも移行していることが示唆された。一方、5-FU は抽出率が腫瘍部位ではシュクロースの抽出率に比べて有意に高いことより、組織間液に選択的に移行した後、さらに腫瘍細胞内にも移行していることが示唆された。ADM や MCNU が腫瘍細胞内にとりこまれなかった原因としては、9L グリオーマの細胞膜にこれらの抗癌剤を輸送する輸送系が存在していないか、あるいは抗癌剤に対する耐性を獲得した癌細胞が発現し得る P-糖蛋白が細胞内に入った薬剤を細胞外にくみ出している³⁰⁾などの可能性が考えられた。一方、5-FU が腫瘍細胞内に移行した原因としては、Wohlhueter ら³⁰⁾がヒトのヘパトーマ細胞において報告しているように、細胞膜におけるピリミジン輸送系などの関与が考えられた。

本研究で得られた結果から判断すると、脳腫瘍の化学療法において抗癌剤を脳腫瘍細胞に選択的に送達させるには、たとえば 5-FU のように血液脳関門の透過性は小さく、反対に標的腫瘍細胞膜の透過性が高い抗癌剤を用いれば良いことが明らかになった。

しかし、ヒトの脳腫瘍では血液脳関門の破壊の程度は個々の症例により、また同一の腫瘍でも部位によって異なっており¹⁶⁾、本研究における 9L グリオーマのように腫瘍組織の毛細血管がすべて関門機構を持たないことはむしろ例外的である。したがって、血液脳関門の透過性が小さい抗癌剤では血液脳関門の存在しない腫瘍本体の治療はできるが、血液脳関門が保たれている腫瘍組織や正常脳組織に浸潤または迷入している腫瘍細胞を治療することはできない。最近、Black ら³⁰⁾は RG-2 グリオーマラットの頸動脈内に血管透過性促進物質であるロイコトリエン C₄ を注入すると腫瘍組織と腫瘍周囲の組織の透過性は亢進したが、正常脳組織の透過性は亢進しなかったと報告した。脳腫瘍に対する抗癌剤の選択的送達については、今後このような脳毛細血管の修飾に関する研究の発展が期待される。

これまで脳腫瘍の化学療法については、主として抗癌剤の血液脳関門の透過性や脳腫瘍細胞の抗癌剤に対する感受性などが考慮されてきたが、本研究で示されたように個々の症例において抗癌剤の腫瘍細胞膜における透過性についても考慮する必要があると思われる。

結 論

脳腫瘍内毛細血管の構造と機能の変化について、9L グリオーマラットを用いて BUI 法と電子顕微鏡により検索し、抗癌剤を脳腫瘍細胞に選択的に送達させるためには抗癌剤にどのような性質が必要であるかを考察した。

1. 細胞外液の指標として用いたシュクロースは、正常ラット、偽手術ラットに比べて 9L グリオーマラットにおいては有意に高い透過性を示し、しかも脳腫瘍組織に選択的に移行していた。

2. 電子顕微鏡で脳毛細血管の構造を観察すると、脳腫瘍以外の脳組織では血液脳関門の構造を保っていたが、脳腫瘍では有窓形成や内皮細胞の不連続性、および接合部の開大などがみられ、透過性の亢進した血管が新たに形成されていることが示唆された。

3. 偽手術ラットにおいては、ADM, MCNU, 5-FU の透過性はシュクロースの透過性と有意差はないが、ACNU はシュクロースに比べて有意に透過していた。したがって、ADM,

MCNU, 5-FU は血液脳関門を透過しにくく、ACNU は透過しやすいことが示唆された。

4. ADM, MCNU, 5-FU は脳腫瘍内に選択的に移行していた。しかし、ADM, MCNU はシュクロースの透過性と有意差がないことより腫瘍細胞内には移行しないこと、また、5-FU はシュクロースよりも有意に透過性が亢進していたことより、腫瘍細胞内に移行していることが示唆された。5-FU の腫瘍細胞内への輸送機構としては腫瘍細胞膜における担体輸送系の関与が考えられた。また、ACNU は腫瘍、皮質、間脳においてシュクロースに比べて有意に透過性が亢進しており、腫瘍内に選択的に移行していなかった。これは ACNU の細胞膜透過がその脂溶性によるためと理解された。

5. 以上の結果は、抗癌剤の脳腫瘍への透過性は、血液脳関門ではなく腫瘍細胞膜により制限されており、したがって抗癌剤を脳腫瘍に選択的に送達させるためには、血液脳関門透過性が低く腫瘍細胞膜透過性が高いという性質を持つ、たとえば 5-FU のような抗癌剤を用いるべきであることを示唆している。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師山下純宏教授に深甚の謝意を表します。また、直接御指導と御協力を頂きました金沢大学がん研究所化学療法部佐々木琢磨教授、田中基裕助教授、金沢大学医学部脳神経外科学教室山崎哲盛助教授、金沢市立病院脳神経外科正印克夫先生、金沢大学薬学部製剤学教室辻 彰教授、寺崎哲也助教授、大西俊正修士に深謝いたします。また、御協力を頂きました脳神経外科学教室の諸先生に感謝の意を表します。さらに、統計学的処理につき貴重な御助言を賜りました、金沢大学医学部衛生学講座橋本和夫教授に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 松谷雅生: 脳腫瘍 (悪性グリオーマ) の化学療法. 最新医学, 46, 1391-1395 (1991).
- 2) Reese, T. S. & Karnovsky, M. J.: Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.*, 34, 207-217 (1967).
- 3) Goldstein, G. W. & Betz, A. L.: Recent advances in understanding brain capillary function. *Ann. Neurol.*, 14, 389-395 (1983).
- 4) Joo, F.: Mini review: Current aspects of the development of the blood-brain barrier. *Int. J. Neuroscience*, 5, 369-372 (1987).
- 5) Pollay, M. & Roberts, P. A.: Blood-brain barrier: A definition of normal and altered function. *Neurosurgery*, 6, 675-685 (1980).
- 6) Pardridge, W. M.: Brain Metabolism: A perspective from the blood-brain barrier. *Physiol. Rev.*, 63, 1481-1535 (1983).
- 7) 坪川孝志: 血液脳関門. *Clinical Neuroscience*, 10, 506-508 (1992).
- 8) Yamada, K., Ushio, Y., Hayakawa, T., Kato, A., Yamada, N. & Mogami, H.: Quantitative autoradiographic measurements of blood-brain barrier permeability in the rat glioma model. *J. Neurosurg.*, 57, 394-398 (1982).
- 9) Blasberg, R. G., Kobayashi, T., Patlak, C. S., Shinohara, M., Miyoaka, M., Rice, J. M. & Shapiro, W.

R.: Regional blood flow, capillary permeability, and glucose utilization in two brain tumor models: Preliminary observation and pharmacokinetic implications. *Cancer Treat. Rep.*, **65**, 3-12 (1981).

10) Nir, I., Levanon, D. & Isosilevsky, G.: Permeability of blood vessels in experimental gliomas: Uptake of ^{99m}Tc -Glucoseheptonate and alteration in blood-brain barrier as determined by cytochemistry and electron microscopy. *Neurosurgery*, **25**, 523-532 (1989).

11) Stewart, P. A., Hayakawa, K., Hayakawa, E., Farrell, C. L. & Del Maestro, R. F.: A quantitative study of blood-brain barrier permeability ultrastructure in a new rat glioma model. *Acta Neuropathol.*, **67**, 96-102 (1985).

12) Hasegawa, H., Ushio, Y., Hayakawa, T., Yamada, K. & Mogami, H.: Changes of the blood-brain barrier in experimental metastatic brain tumors. *J. Neurosurg.*, **59**, 304-310 (1983).

13) Sage, M. R.: Blood-brain barrier: Phenomenon of increasing importance to the imaging clinician. *Am. J. Radiol.*, **138**, 887-898 (1982).

14) 柴田尚武: 脳腫瘍と血液脳関門. *脳神経外科*, **20**, 1135-1147 (1992).

15) Levin, V. A. & Kabra, P.: Effectiveness of the nitrosoureas as a function of their lipid solubility in the chemotherapy of experimental rat brain tumors. *Cancer Chemother. Rep.*, **58**, 787-792 (1974).

16) 星野孝夫: 悪性脳腫瘍の化学療法—その pharmacokinetics. *脳神経外科*, **8**, 1007-1016 (1980).

17) Rapoport, S. I., Hori, M. & Klatzo, I.: Testing of a hypothesis for osmotic opening of the blood-brain barrier. *Am. J. Physiol.*, **223**, 323-331 (1972).

18) Neuwelt, E. A., Diehl, J. T., Vu, L. H., Hill, S. A., Michael, A. J. & Frenkel, E. P.: Monitoring of methotrexate delivery in patients with malignant brain tumors after osmotic blood-brain barrier disruption. *Ann. Intern. Med.*, **94**, 449-454 (1981).

19) 岩崎祐三, 鈴木倫保, 山本悌司, 今野秀彦: 薬物による血液脳関門の開放. *神経進歩*, **28**, 572-579 (1984).

20) Hasegawa, H., Allen, J. C., Shapiro, W. R. & Posner, J. B.: Enhancement of CNS penetration of methotrexate by hyperosmolar intracarotid mannitol and carcinomatous meningitis. *Neurology*, **29**, 1280-1286 (1979).

21) Hiesiger, E. M., Voorhies, R. M., Basler, G. A., Lipschutz, L. E., Posner, J. B. & Shapiro, W. R.: Opening the blood-brain and blood-tumor barriers in experimental rat brain tumors: The effect of intracarotid hyperosmolar mannitol on capillary permeability and blood flow. *Ann. Neurol.*, **19**, 50-59 (1986).

22) Salahuddin, T. S., Johansson, B. B., Kalimo, H. & Olsson, Y.: Structural change in the rat brain after carotid infusions of hyperosmolar solutions. *Acta Neuropathol.*, **77**, 5-13 (1988).

23) Oldendorf, W. H.: Measurement of brain uptake of radiolabeled substances using a tritiated water internal

standard. *Brain Res.*, **24**, 372-376 (1970).

24) Oldendorf, W. H.: Brain uptake of radio labeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection. *Am. J. Physiol.*, **221**, 1629-1639 (1971).

25) Barker, M., Hoshino, T., Gurcay, O., Wilson, C. B., Nielsen, S. L., Downie, R. & Elison, J.: Development of an animal brain tumor model and its response to therapy with 1, 3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Cancer Res.*, **33**, 976-986 (1973).

26) Benda, P., Someda, K., Messer, J. & Sweet, W. H.: Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J. Neurosurg.*, **34**, 310-323 (1971).

27) Pardridge, W. M. & Fierer, G.: Blood-brain barrier transport of butanol and water relative to N-isopropyl-p-iodoamphetamine as the internal reference. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **5**, 275-281 (1985).

28) Richard, N. P. & Jatlow, P.: Measurement of adriamycin (doxorubicin) and its metabolites in human plasma using reversed-phase high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatography*, **164**, 471-478 (1979).

29) Hirano, A. & Zimmerman, H. M.: Fenestrated blood vessels in a metastatic renal carcinoma in the brain. *Lab. Invest.*, **26**, 465-469 (1972).

30) Levin, V. A., Landahl, H. D. & Freeman-Dove, M. A.: The application of brain capillary permeability coefficient measurements to pathological conditions and the selection of agents which cross the blood-brain barrier. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **4**, 499-519 (1976).

31) Spector, R. & Berlinger, W. G.: Localization and mechanism of thymidine transport in the central nervous system. *J. Neurochem.*, **39**, 837-841 (1982).

32) Cornford, E. M. & Oldendorf, W. H.: Independent blood-brain barrier transport systems for nucleic acid precursors. *Biochim. Biophys. Acta*, **394**, 211-219 (1975).

33) Wohlhueter, R. M., Mcivor, R. S. & Plagemann, P. G. W.: Facilitated transport of uracil and 5-Fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. *J. Cell. Physiol.*, **104**, 309-319 (1980).

34) Arena, E. D., Alessandro, N., Dusonchet, L., Gebbia, N., Gerbasi, F., Sanguedolce, R. & Rausa, L.: Influence of pharmacokinetic variations on the pharmacological properties of adriamycin. In S. K. Carter, A. Di Marco, M. Ghione, I. H. Krakoff & G. Mathe (eds.), *International Symposium on Adriamycin*, p96-116, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, (1972).

35) Kimura, K., Fujita, H. & Sakai, Y.: Blood levels, tissue distribution and clinical effects of adriamycin. In S. K. Carter, A. Di Marco, M. Ghione, I. H. Krakoff & G. Mathe (eds.), *International Symposium on Adriamycin*, p124-134, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, (1972).

36) Skovsgaard, T.: Mechanisms of resistance to daunorubicin in ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res.*, **38**,

1785-1791 (1978).

37) 横山正和: ACNU. 癌と化学療法, 7, 339-349 (1980).

38) 原田 廉, 木矢克造, 小林益樹, 武田哲二, 向田一敏, 魚住 徹: 新水溶性ニトロソウレア抗癌剤 MCNU の脳腫瘍患者

における生体内動態. 癌と化学療法, 8, 735-742 (1981).

39) Black, K. L., King, W. A. & Ikezaki, K.: Selective opening of the blood-tumor barrier by intracarotid infusion of leukotriene C4. J. Neurosurg., 72, 912-916 (1990).

Pharmacological and Ultrastructural Study of Drug Transfer in Rats with 9L Glioma Yoshio Nakashima, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., 103, 599—609 (1994)

Key words blood-brain barrier, brain uptake index, chemotherapy, 9L glioma

Abstract

The effect of chemotherapy on malignant brain tumors largely depends on the transfer of anticancer agents through the blood-brain barrier. In the present study, drug transfer and the fine structure of the brain and tumor capillaries were investigated in rats with 9L glioma, using the brain uptake index (BUI) method and electron microscopy. The transfer of anticancer agents through the capillary endothelial cells and the tumor cell membrane was studied. Sucrose, which was used as an extracellular space marker, was specifically transferred into the tumor tissue. The endothelial cells of tumor vessels ultrastructurally showed increased permeability which was represented by fenestrations, discontinuity and disrupted junctions, but endothelial cells of the brain capillary showed an intact blood-brain barrier. Adriamycin (ADM), 1-(2-chloroethyl)-3-(methyl α -D-glucopyranos-6-yl)-1-nitrosourea (MCNU), 5-fluorouracil (5-FU) were specifically transferred into the tumor tissue. It was suggested that 5-FU was transferred into the tumor cells, because 5-FU was transferred into the tumor tissue more than sucrose. 1-(4-amino-2methyl pyrimidine-5-yl)-methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride (ACNU) was transferred into both the tumor and brain tissues. In conclusion, the drug transfer into the tumor tissue is restricted by the tumor cell membrane rather than by the disrupted blood-brain barrier. This pharmacokinetic study revealed that the drugs, which are transferred through the tumor cell membrane, but not through the intact blood-brain barrier, should be used as anticancer agents in this brain tumor model lacking in the blood-brain barrier in the tumor tissue.